

РЕПУБЛИКА БЪЛГАРИЯ

(19) BG

(11)
5(51)

50996A

C 07 H 15/234

C 12 P 19/54

C 12 R 1:465



ОПИСАНИЕ НА ИЗОБРЕТЕНИЕ

ПО

АВТОРСКО СВИДЕТЕЛСТВО

ИНСТИТУТ ЗА ИЗОБРЕТЕНИЯ И РАЦИОНАЛИЗАЦИИ

(21) Регистров № 93817

(22) Заявено на 11.02.91

Приоритетни данни

(31) (32) (33)

(41) Публикувана заявка в
бюлетин № на

(45) Отпечатано на 29.01.93

(46) Публикувано в бюлетин № 1
на 15.01.93

(56) Информационни източници:
US 3853709

(71) Заявител(и):

Технологичен комбинат за
промишлена микробиология,
Разград

(72) Изобретател(и):

Динко Георгиев Динков
Валентин Всеволодов Лосев
Атанаска Костова Димитрова
Разград

(62) Разделена заявка от рег.

(89) № на документа в
страната заявител:

(54) МЕТОД ЗА ПОЛУЧАВАНЕ НА ТОБРАМИЦИН

(57) Методът намира приложение във фармацевтичната промишленост. С него се увеличава часовата производителност на антибиотика. По метода се култивира щам *Streptomyces tenebrarius*, регистриран в НБПМКК под № 841, при условия на регулируем биосинтез в хранителна среда, към която след 24-ия час дозирано се добавя лимитиращ субстрат. Субстратът има следния състав в %: глюкоза от 4,0 до 7,5, NH_4Cl от 0,25 до 0,30, карбамид от 0,10 до 0,130, Са-пантотенат от 0,008 до 0,010, На-глутамат от 0,006 до 0,010 и KCl от 0,008 до 0,12 в обем от 15-35% спрямо културалната течност, така че да се поддържа концентрация на глюкозата от 0,5 до 1,5%, и амонячен азот от 0,010 до 0,020% спрямо общия обем.

1 претенция

BG 50996 A

(54) МЕТОД ЗА ПОЛУЧАВАНЕ НА ТОБРАМИЦИН

Изобретението се отнася до метод за получаване на антибиотика тобрамицин, който намира приложение във фармацевтичната промишленост и хуманната медицина.

Известно е, че за получаването на тобрамицин се използва ферментационен метод, като биосинтезът се осъществява от растяща култура *Streptomyces tenebrarius*, продуцираща т.нар. небрамицинов комплекс, състоящ се от тобрамицин, апрамицин и следи от канамицин В. Основният целеви продукт е тобрамицина - аминоклюкозиден антибиотик.

Култивирането на шам *Streptomyces tenebrarius* 17920 АТСС

се извършва върху производствена хранителна среда, съдържаща в %: декстроза 1, соев шрот 1,5, кисел калиев фосфат 0,05, магнезиев сулфат 0,5, калиев хлорид 0,1, воден калциев хлорид 0,025 и антипенители.

Недостатъците на описания метод са ниския титър на целевия продукт, както и това, че описаните изходни хранителни среди се разглеждат като лимитиращи за крайния резултат и не се посочват начини за интензифициране на биосинтеза. Не се разглежда и подаване на лимитиращи субстрати и стимулиращи биосинтеза фактори.

Задачата на изобретението е да се създаде ефективен метод за интензифициран биосинтез на тобрамицин.

Създаден е метод за биосинтез на тобрамицин, характеризиращ се с това, че се постига увеличение добива на антибиотика. Чрез култивиране на шам *Streptomyces tenebrarius*, регистриран под № 841 в НБПМКК=17920 АТСС, в условия на регулируем процес, при който в хода на активния биосинтез се дозира лимитиращ субстрат и едновременно с това се поддържа стойността на рН в определени оптимални за продуцирането на тобрамицин граници. Лимитиращия субстрат има следния състав в %: глюкоза от 4,0 до 7,5, NH_4Cl от 0,15 до 0,30, карбамид от 0,10 до 0,30, Са - пантотенат от 0,008 до 0,010, Na-глутамат от 0,006 до 0,010, KCl от 0,008 до 0,012 в обем 15 - 35 % спрямо обема на културалната течност.

Дозирането на разтвора се извършва след 24-ия час, като скоростта се регулира така,

че в средата да се поддържа концентрация на глюкоза от 0,5 до 1,5 % и амонячен азот от 0,010 до 0,020 %. След 24-ия час рН се регулира в граници 6,60 - 7,10% с разтвор на NH_4OH .

Предимството на метода съгласно изобретението се състои във възможността за увеличаване на часовата производителност в хода на ферментационния процес чрез дозирано подаване на лимитиращ субстрат, позволяващо и удължаване на ефективния биосинтез.

Изобретението се илюстрира със следния пример.

Биосинтезът е осъществен в 50 л ферментатор, зареден с 30 л ферментационна хранителна среда със следния състав в %: соев шрот 3,0, глюкоза 3,0, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,6, NH_4Cl 0,4, CaCO_3 0,4, соево масло 1, силикон SAG - 471 0,00066. Средата се стерилизира 30 мин при 121°C и се охлажда до 37°C.

Ферментационната хранителна среда се инокулира с 1% вегетативен посевен материал, култивиран върху хранителна среда със следния състав в %: глицерин 2, царевичен екстракт 2, NH_4Cl 0,2, CaCO_3 0,5, вода до 1000 мл.

рН преди стерилизация се коригира с 40% NaOH до 6,50. Средата се стерилизира 30 мин при 120°C и се охлажда до 37°C.

Култивирането на ферментационната хранителна среда се провежда при следния режим: температура -37°C, свръхналягане - 0,5 атмосфери, аерация - 1 литър/литър в минута, обороти на бъркалката - 300⁻¹.

В хода на ферментационния процес се извършва периодичен анализ на съдържанието на глюкоза, амонячен азот, общ азот и стойността на рН.

Поддържането на азотния и въглеродния метаболизъм се осъществява чрез дозирано подаване на лимитиращ субстрат, съдържащ: глюкоза 2 кг, NH_4Cl 0,050 кг, карбамид 0,050 кг, Са - пантотенат 0,0025 кг, Na - глутамат 0,0025 кг, KCl 0,0025 кг, вода до 5 л.

Подхранващият разтвор е включен на 23-ия час на ферментационния процес, като скоростта на дозиране е регулирана в зависимост от анализа на глюкозата в граници 0,50 - 1,50% и амонячен азот в граници 0,010 - 0,020 мг%. Стойността на рН е поддържана в оптималните за биосинтеза на тобрамицин

граница 6,80 - 7,10 чрез подаване на 20% разтвор NH_4OH . Титърът на целевия продукт е измерен чрез биохроматографски метод и чрез метод на високоефективна течностна хроматография - ВЕТХ. На 137-ия час са измерени следните титри:

-биохроматографски метод - 1812 ед/мл тобрамицин (приложение 1)

- ВЕТХ - 1760 ед/мл тобрамицин (приложение 2)

Използван е метод на високоефективна течностна хроматография. HPLC (от High Performance Liquid Chromatography) на апарат HAWLET PACKARD-USA). Измерва се количеството само на тобрамицин след колонна дериватизация спрямо международен стандарт на същия антибиотик.

Средният резултат от двата анализа е три пъти по-висок от постигнатото досега, което се илюстрира с резултатите от таблица 1.

Таблица 1

| Вариант | Активност ед/мл по HPLC | Увеличение в % |
|---|-------------------------|----------------|
| Контрола | 525 | - |
| 1. Дозиране на глюкоза | 610 | +16 |
| 2. Дозиране на соев шрот | 560 | +6,7 |
| 3. Съчетано дозиране на глюкоза и соев шрот | 630 | +20 |

1. при дозиране само на глюкозен р-р (като е потвърдена концентрация в средата 0,5-1,5%)

2. дозиране на соев шрот, като стерилизирана соева суспензия във вода, на 24, 48, 72 и 96 часа в количество 0,5% т.е. общо 20 г/л разпределено на 4 дозирания

3. смесен вариант от 1 до 2.

Правени са и множество експерименти с добавяне на различни микроелементи, соли, аминокиселини и др. както в изходната среда, така и по време на биосинтеза.

Индивидуално са изпитани и компонентите на разтвора, дозирани в количества, идентични с тези по предложението.

Прирастът за всеки от тях е следния.

| | | |
|-------------------|------|----|
| Натриев глутамат | +7% | 10 |
| Калиев пантотенат | +12% | |
| Карбамид | +23% | |
| Калиев хлорид | +4% | |

Комбинацията им, заедно и с глюкозата, 15 очевидно стимулират специфични регулаторни механизми в биосинтеза, които водят до увеличение на прираста, изразяващо се не в проценти, а в пъти.

Приложение 1- Биохроматографско 20 определяне активността на тобрамицин.

Приложение 2- Определяне активността на тобрамицина чрез BETX.

Авторски претенции

Метод за получаване на тобрамицин чрез култивиране на шам *Streptomyces tenebrarius*, рег. под № 841 в НБПМКК, върху хранителна среда, съдържаща усвояеми въглеродни и азотни източници, характеризиращ се с това, че след 24-ия час от ферментацията към хранителната среда дозирано се добавя лимитиращ субстрат, съдържащ в %: глюкоза от 4,0 до 7,5, NH_4Cl от 0,15 до 0,3, карбамид от 0,10 до 0,30, Са-пантотенат от 0,008 до 0,010, Na-глутамат от 0,006 до 0,010, и KCl от 0,008 до 0,12 в обем от 15 - 35% спрямо културалната течност, така че да се поддържа концентрация на глюкоза от 0,5 до 1,5 %, и на амонячен азот от 0,010 до 0,020% спрямо целия обем.

Литература

1. US 3853709.

Издание на Института за изобретения и рационализации
София - 1113, бул. "Г. М. Димитров" 52-Б

Експерт: Д. Кацарова

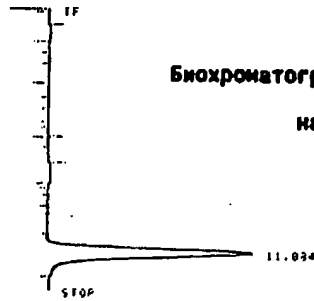
Редактор: А. Семерджиева

Пор. 36581

Тираж: 40 СК

50996

4 RUN 8 9 JAN 25, 1991 15:10:45
STN#1



ПРИЛОЖЕНИЕ 1
Биохроматографско определяне активността
на тобрамицин

СТАНДАРТ Тобрамицин
934 ед/мл

Closing signal file M1SIGNAL.BNC

RUN# 9 JAN 25, 1991 15:10:45

SIGNAL FILE: M1SIGNAL.BNC

AREA#

PT AREA TYPE WIDTH AREA#
11.034 251957 PV 1.52 100.00000

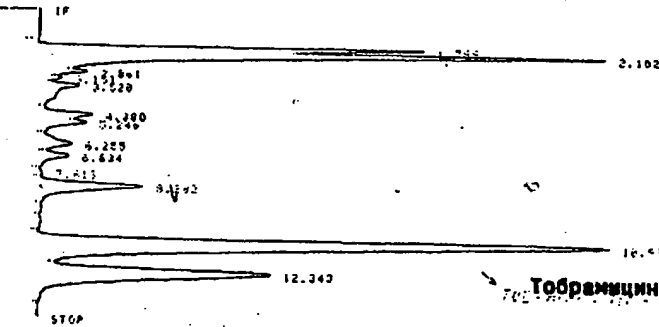
TOTAL AREA=196757

MUL FACTOR=1.0000E+00

* LIST: ZERO = 0. -0.027

* RUN# 11 JAN 25, 1991 15:41:59

STN#1



Тобрамицин 1760 ед/мл

Closing signal file M1SIGNAL.BNC

RUN# 11 JAN 25, 1991 15:41:59

SIGNAL FILE: M1SIGNAL.BNC

AREA#

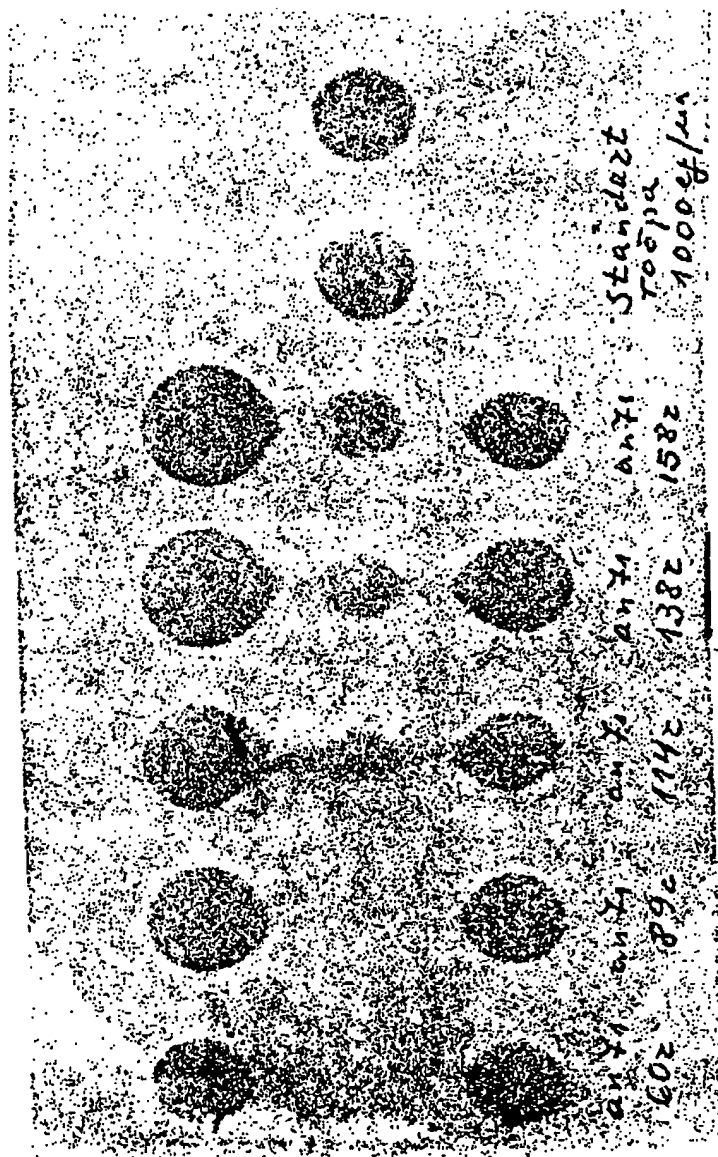
| PT | AREA | TYPE | WIDTH | AREA# |
|--------|---------|------|-------|----------|
| 1.769 | 2097323 | BV | .214 | 10.00026 |
| 2.102 | 4278205 | VV | .306 | 20.87575 |
| 2.061 | 312481 | VV | .246 | 1.48956 |
| 3.151 | 140813 | VV | .231 | .66763 |
| 3.920 | 548672 | VV | .523 | 2.41413 |
| 4.080 | 464228 | VV | .338 | 2.21348 |
| 5.244 | 428179 | VV | .344 | 2.04140 |
| 4.255 | 451656 | VV | .458 | 2.05819 |
| 6.834 | 301513 | TV | .372 | 1.43767 |
| 7.613 | 55928 | VV | .391 | .26667 |
| 8.262 | 1153505 | VV | .422 | 5.50034 |
| 10.793 | 7300186 | VV | .587 | 34.80086 |
| 12.343 | 3360869 | VV | .561 | 16.82498 |

TOTAL AREA=2.0973E+07

MUL FACTOR=1.0000E+00

ПРИЛОЖЕНИЕ 2

Определение на активността на тобрамицина чрез ВЕТХ



PTO 2006-3829

Bulgarian Patent

Document No. 50,996A

A METHOD FOR TOBRAMYCIN PRODUCTION

[METOD ZA POLUCHAVANE NA TOBRAMICIN]

Dinko Georgiev Dinkov, Valentin Vsevolodov Losev, and Atanaska

Kostova Dimitrova

UNITED STATES PATENT AND TRADEMARK OFFICE

Washington, D.C.

APRIL 2006

Translated by: Schreiber Translations, Inc.

Country : Bulgaria

Document No. : 50,996A

Document Type : Patent description

Language : Bulgarian

Inventors : Dinko Georgiev Dinkov,
Valentin Vsevolodov Losev, and
Atanaska Kostova Dimitrova

Applicant : Technology Center for Industrial
Microbiology (City of Razgrad,
Bulgaria)

IPC : C 07 H 15/234; C 12 P 19/54;
C 12 R 1:465

Application Date : February 11, 1991

Publication Date : January 29, 1993

Foreign Language Title : Metod za poluchavane na Tobramicin

English Title : A method for Tobramycin production

A METHOD FOR TOBRAMYCIN PRODUCTION

Abstract

The invention pertains to pharmaceutical industry; specifically, the method allows increasing the hourly yield of the antibiotic. According to the invented method, we cultivated *Streptomyces tenebrarius* (a strain registered with the National Bank of Industrial Microorganisms & Cell Cultures; Reg. # 842) under conditions of controlled biosynthesis in a nutrient medium with batch-wise adding of a limiting substrate after 24 hrs of fermentation. Our limiting substrate has the composition as follows (in %): Glucose - from 4.0 to 7.5; NH₄Cl - from 0.25 to 0.30; Carbamide - from 0.10 to 0.130; Ca-pantothenate - from 0.008 to 0.010; Na-glutamate - from 0.006 to 0.010, and KCl - from 0.008 to 0.12 (in the amount of 15 to 35 % by volume relative to the culture liquid); the concentration of glucose is maintained in the range of 0.5 to 1.5 %; and that of ammonia nitrogen in the range from 0.010 to 0.020 % of the volume total.

1 claim.

REFERENCES/PROTOTYPES:

1. US Patent 3,853,709

¹ Numbers in the margin indicate pagination in the foreign text.

/2

A METHOD FOR TOBRAMYCIN PRODUCTION

The invention pertains to the methods for production of Tobramycin, an antibiotic; the invented method may find application in the pharmaceutical industry and human medicine.

It is known that the production of Tobramycin now is based on the fermentation where biosynthesis is realized through the cultivation of *Streptomyces tenebrarius* culture, which generates the so-called nebramycin complex containing Torbamacyn, Apramycin, and also the traces Canamycin B. The primary target product is Tobramacyn, an aminoglycoside antibiotic.

According to the conventional method, the strain of *Streptomyces tenebrarius*, ATTC 17920, is cultivated in the process nutrient medium, which contains (in %): Dextrose - 1; Soybean cake - 1.5; Acidic potassium phosphate - 0.05; magnesium sulfate - 0.5; potassium chloride - 0.1; hydrous calcium chloride - 0.025, and antifoaming agents.

The limitations of the known method are a low titer of the target product, and also that the initial nutrient mediums illustrate only the limiting characteristics; they do not show any ways for intensification of biosynthesis. Further, the known process disregards the application of limiting substrates and biosynthesis stimulating factors.

The object of the invention is to create an efficient method for Tobramacyn biosynthesis intensification.

We have invented a method of Tobramacyn biosynthesis characteristic of that the higher yields of the antibiotic are being obtained through the cultivation of a strain of *Streptomyces tenebrarius*, ATTC 17920, (registered with the National Bank of Industrial Microorganisms & Cell Cultures; Reg. # 842) under conditions of a controlled process with batch-wise adding of a limiting substrate and simultaneous maintaining of pH values within a certain range, which is optimal for production of Tobramycin. The limiting substrate has the composition as follows (in %): Glucose - from 4.0 to 7.5; NH_4Cl - from 0.25 to 0.30; Carbamide - from 0.10 to 0.130; Ca-pantothenate - from 0.008 to 0.010; Na-glutamate - from 0.006 to 0.010, and KCl - from 0.008 to 0.012 (in the amount of 15 to 35 % by volume relative to the culture liquid).

Batch-wise adding of the solution is being started after 24 hrs of fermentation, and the rate of adding is controlled in a

way of maintaining in the medium the concentrations as follows: Glucose - from 0.5 to 1.5 %; Ammonia nitrogen - from 0.010 to 0.020 %. After expiration of 24 hrs, the pH of the medium is adjusted by NH_4OH to be kept within the range of 6.60 - 7.10 %.

The advantage of our invented method is the opportunity to increase the hourly yield of the antibiotic resulting from the fermentation process through batch-wise adding of a limiting substrate, which secures an efficient biosynthesis and also extends its duration.

Let us exemplify our invented method as follows:

Biosynthesis was realized in a 50 l fermenter charged with a fermentative nutrient medium of the composition as follows (in %): Soybean cake - 3.0; Glucose - 3.0; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ - 0.6; NH_4Cl - 0.4; CaCO_3 - 0.4; Soybean oil - 1; Silicone (Type SAG-471) - 0.00066. The medium was sterilized over 30 min at 121 °C, and then cooled up to 37 °C.

The fermentative nutrient medium was inoculated with 1 % of vegetative seeding material cultivated on a nutrient medium of the following composition (in %): Glycerin - 2; Corn extract - 2; NH_4Cl - 0.2; CaCO_3 - 0.5; Water - up to 1,000 ml.

Prior to sterilization the pH value is adjusted by 40 % of NaOH to 6.50. The medium is sterilized over 30 min at 120 °C, and then cooled up to 37 °C.

Cultivation in the fermentative nutrient medium is carried out under the following conditions: Temperature - 37 °C; excess pressure - 0.5 atmospheres; Aeration - 1 l/l per min; mixer speed - 300 revolutions per minute.

During the process of fermentation the mixture is analyzed periodically for concentrations of glucose, ammonia nitrogen, total nitrogen, and pH value.

The nitrogen and hydrocarbon metabolism was maintained through batch-wise adding of the limiting substrate, which contains glucose (2 kg); NH_4Cl (0.050 kg); carbamide (0.050 kg); Ca-pantothenate (0.0025 kg); Na-glutamate (0.0025); KCl (0.0025 kg), and water up to 5 l.

We started to add the supplementary solution on the 23-rd hour of the fermentation process (the rate of batch-wise adding is being controlled depending on analysis for glucose and ammonia nitrogen to keep their concentrations in the range of 0.50 to 1.50 % and 0.010 to 0.020 mg%, respectively).

/3

The pH values were maintained within the range of 6.80 - 7.10 (optimal for biosynthesis of Tobramycin) by adding a 20 % solution of NH_4OH . The titers of the target products were measured with a biochromatography method, and also with High Performance Liquid Chromatography (HPLC). The titers measured on the 137th hour were as follows:

- Biochromatography method: 1,812 Units/ml of Tobramycin (See Appendix 1);
- High Performance Liquid Chromatography (HPLC): 1,760 Units/ml of Tobramycin (See Appendix 2).

High Performance Liquid Chromatography (HPLC) determinations were made using a Hewlett-Packard unit (USA). The values of Tobramycin measured with column derivatization complied with the international standards for this antibiotic.

As follows from Table 1, the average yields as estimated with the two above methods are three times higher those with the previous method.

Table 1

| Version | Activity, Units/ml (HPLC method) | Increase (in %) |
|--|-------------------------------------|-----------------|
| Reference | 525 | - |
| 1. Batch-wise adding of glucose | 610 | +16 |
| 2. Batch-wise adding of soybean cake | 560 | +6.7 |
| 3. Combined adding of glucose and soybean cake | 630 | +20 |
| 1. At batch-wise adding glucosene solution only (which concentration in the medium was maintained in the range of 0.5 to 1.5 % | | |
| 2. At batch-wise adding of soybean cake as a sterilized soybean suspension in water at 24, 48, 72, and 96 hrs in 0.5 % concentrations, i.e. 20 g/l in total was distributed into 4 | | |

| |
|--------------------------------|
| doses |
| 3. Combined version of 1 and 2 |

/4

We have completed a number of experiments with adding of various micro components, salts, amino acids, etc. both to the initial medium and during the course of biosynthesis.

Further, we tested individually the components of solution which were added batch-wise in the concentrations as proposed above as per our invention.

The percentage values of increase of the yield resulting from the individual components were as follows:

| | |
|------------------------|--------|
| Sodium glutamate | +7 % |
| Potassium pantothenate | +12 % |
| Carbamide | + 23 % |
| Potassium chloride | +4 % |

It may be suggested that the combination of these components, and also glucosate does stimulate certain specific regulatory mechanisms in biosynthesis which lead to a several times, not a few percent increase of the yield.

Appendix 1. Determination of Tobramycin activity with a biochromatography method.

Appendix 2. Determination of Tobramycin activity with High Performance Liquid Chromatography (HPLC) method.

The Claim

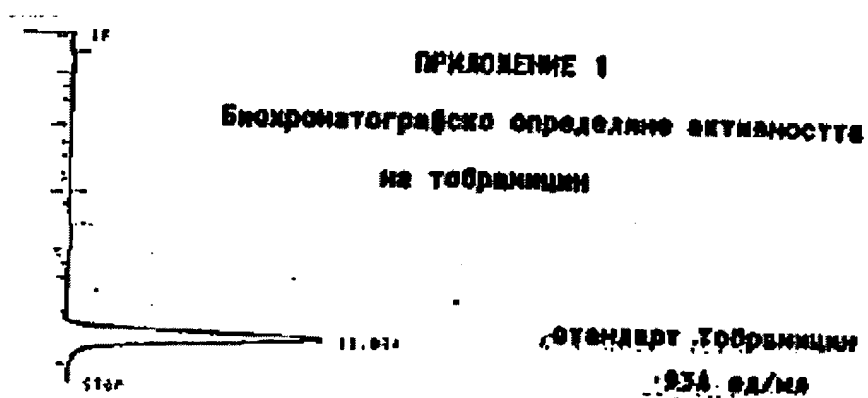
A method for Tobramycin production through cultivation of *Streptomyces tenebrarius* (a strain registered with the National Bank of Industrial Microorganisms & Cell Cultures; Reg. # 842) in a nutrient medium containing the digestable hydrocarbon and nitrogen sources; the method characteristic of that after 24 hrs of fermentation to the nutrient medium is being added batch-wise a limiting substrate of the composition as follows (in %): Glucose - from 4.0 to 7.5; NH_4Cl - from 0.25 to 0.30; Carbamide - from 0.10 to 0.30; Ca-pantothenate - from 0.008 to 0.010; Na-glutamate - from 0.006 to 0.010, and KCl - from 0.008 to 0.12 (in the amount of 15 to 35 % by volume relative to the culture liquid); the concentration of glucose is maintained in the range of 0.5 to 1.5 %; and that of ammonia nitrogen in the range from 0.010 to 0.020 % of the volume total.

REFERENCES

1. US Patent 3853709

APPENDIX 1

Determination of Tobramycin activity with a
biochromatography method



Tobramycin

reference standard

934 Units/ml

